

植物生物学实验-植物生理部分

实验九 长春花愈伤组织的诱导培养及吲哚生物碱的提取测定（1）

长春花——生产抗癌生物碱的药用植物



【实验原理】

- 在无菌条件下，对离体的植物组织（器官或细胞）进行人工培养，可以使已经停止分化生长的细胞重新分裂，形成没有组织结构的细胞团，即愈伤组织，这一过程称为“脱分化作用”。



- Initiates cell division when present with auxin.
- Causes differentiation in callus. High CK→ shoots;

【实验目的】

- 掌握诱导和继代愈伤组织的方法，以及提取和测定生物碱的方法。

【实验材料】

- 长春花植株（新鲜幼嫩的茎、叶、芽或根）。

【实验内容与步骤】

1. 长春花愈伤组织的诱导及继代培养

(1) 培养基的配制:

按附录所示MS培养基配方，已预先配制好大量元素、微量元素、铁盐和有机溶剂的母液。根据配制的体积来计算用量，同时加入不同配比的激素制成诱导和继代培养基（参照表1），并调pH至5.8--6.2，分装于50mL锥形瓶中，每瓶含有培养基25mL，高压灭菌20 min，静置冷却备用。

表一 诱导和继代培养基的配法

母液名称及浓度	配1L诱导愈伤培养基	配1L愈伤继代培养基
大量元素20×	50 mL	50 mL
微量元素 I 200×	5 mL	5 mL
微量元素 II 1000×	1 mL	1 mL
铁盐 100×	10 mL	10 mL
有机溶剂 100×	10 mL	10 mL
琼脂	7.2g	7.2g
蔗糖	30g	30g
萘乙酸 (NAA) 1g/L	0.5 mL	2 mL
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 1g/L	1mL	
6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 1g/L	0.5 mL	1mL

【实验要求】

1. 每个实验组要求配8瓶培养基，每瓶25mL.

- 4瓶的MS愈伤培养基
(2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D))
- 4瓶的MS继代培养基

- 2.配培养基时注意在加入琼脂粉前将PH调到5.8--6.2，过酸培养基不凝，过碱培养基太硬，不利于接种。调pH时用pH试纸（三盒），从范围大的到范围小的调。
- 3.在超净台中，无菌操作。



(2) 愈伤组织的诱导

- 剪取长春花新鲜幼嫩的叶，用自来水冲洗**30 min**，再用蒸馏水反复冲洗，然后用**10%**的安替福民（次氯酸钠）浸泡**5 min**消毒备用。
- 在无菌条件下，用手术刀将消毒的植物材料切成**0.5cm**长宽的小块，再将小块的材料放入无菌水中反复冲洗，然后转接至培养基上（每瓶接种**3~4**块），**26~28℃**光培养。

(3) 愈伤组织的继代培养:

30天左右，将诱导而来的愈伤组织从外植体上剥离，转至新的培养基上继代培养，以后每20天左右继代一次，接种0.5~1.0g/瓶，培养条件同上。

(4) 愈伤组织生长的测定

将长春花愈伤组织从培养基上剥离，称鲜重（取3瓶组织鲜重平均值）。

下次实验的内容:

2. 吲哚总碱的分离提取

3. 阿玛碱和长春质碱的定性定量分析